

## 大豆花叶病毒胁迫诱导的消减文库构建及初步分析 Construction and Primary Analysis of Subtractive Library Induced by Soybean Mosaic Virus (SMV)

刘春燕<sup>1</sup>, 王伟权<sup>2</sup>, 陈庆山<sup>1\*</sup>, 杨翠平<sup>2</sup>, 李文滨<sup>1</sup>, 辛大伟<sup>1</sup>, 金振国<sup>1</sup>, 宋英博<sup>1</sup>

LIU Chun-Yan<sup>1</sup>, WANG Wei-Quan<sup>2</sup>, CHEN Qing-Shan<sup>1\*</sup>, YANG Cui-Ping<sup>2</sup>, LI Wen-Bin<sup>1</sup>,  
XIN Da-Wei<sup>1</sup>, JIN Zhen-Guo<sup>1</sup> and SONG Ying-Bo<sup>1</sup>

1. 东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨 150030

2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275

1. *Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*

2. *College of Life Sciences Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China*

**摘 要** 大豆花叶病毒病是危害大豆产量和品质的主要病害之一, 通过分子手段研究大豆花叶病毒病基因的抗病相关基因表达可以辅助抗病育种工作。利用 SSH 技术, 对抗大豆花叶病毒病的大豆品种 8143 进行分析, 构建大豆花叶病毒胁迫诱导表达的 cDNA 文库, 并对文库进行初步分析。

**关键词** 大豆花叶病毒病, 抑制消减杂交技术 (SSH), cDNA 文库

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0320-03

**Abstract** SMV is one of main diseases of soybean, which could affect yields and quality of soybean seriously. It was effective to soybean breeding by studying the expression of resistant gene to SMV with molecular technology. In this study, a soybean resistance line, DongNong 8143, was used to construct a subtractive cDNA library by SSH from soybean leaves inoculated by SMV No.1 at primary stage. cDNA dominantly or specifically expressed in infected leaves was purified using PCR Purification Kit and cloned into pGEM-T easy vector. Colonies were grown on LB-agar plates containing ampicillin, X-gal and IPTG. A subtractive plasmid library was constructed by SSH. Then the library was transformed to host bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$ , and the titer of the library was measured as  $2 \times 10^3$ . 64 clones were picked up randomly and sequenced. Of them there is 50 clones which result of sequenced were good. The length of EST fragment varied from 136bp to 691bp, and the average length is 456bp. Among them, 41 sequences has poly(A). Through ESTs were compared with sequences in unigene database of GeneBank with BLASTn and BLASTx algorithm, 38 ESTs of them had comparatively clear results and the percent of them in acquired ESTs is 74%. The EST expression profile showed that the resistance-related genes include cell protection, signal transduction, restrict pathogen growth, system acquired resistance, and house-keeping gene. There are 12 ESTs, which have not comparatively clear results, that maybe new genes.

**Key words** soybean mosaic virus, suppression subtractive hybridization(SSH), cDNA library

Received: September 13, 2004; Accepted: December 1, 2004.

This work was supported by Grant the National High Technology Research and Development Program of China(No.2001AA211041) and Young Science Foundation of Harbin(No.2002AFQXJ043).

\* Corresponding author. E-mail: qshehen@sohu.com

国家“863”高技术研究发展计划项目(No.2001AA211041), 哈尔滨市青年科学研究基金(No.2002AFQXJ043)。

大豆花叶病毒病(Soybean Mosaic Virus)是世界性病害,分布广,危害严重。目前已报道能侵染大豆的病毒已超过60种。而在田间能感染大豆的病毒已超过37种。80年代以来黑龙江省由南向北蔓延,黑龙江省南部已成重病区,该病不仅使大豆产量下降,而且能导致大豆子粒产生褐斑,影响大豆品质,降低商品价值。

中国加入世贸组织之后,大豆生产对高产和优质的要求越来越强烈。因此,如何防治大豆花叶病毒病的危害,以保证优质高产潜力的发挥,减少经济损失,就显得日益重要。大豆花叶病毒病为种子带毒,难以用化学药剂控制,培育抗病品种是最经济有效的措施。目前的抗源多数熟期偏晚,应用有一定困难。又由于传统育种方法所需时间长,对一些不良农艺性状的改变比较缓慢,因而迫切需要更加有效的育种或辅助育种的方法。近年来,随着分子生物学的发展,DDRT、cDNA-RDA、SSH等植物基因差异表达分析方法为寻找大豆抗花叶病毒病基因提供了有利的工具。SSH是新近发展起来的研究差异表达基因的技术,该技术应用两次差减杂交和两次抑制性PCR,表现了独特的优越性<sup>[1,2]</sup>。目前,采用SSH等技术研究植物抗病基因已成为植物生物学的研究热点之一。

本研究旨在利用SSH技术,对抗大豆花叶病毒病的大豆品种8143进行分析,构建大豆花叶病毒胁迫诱导表达的cDNA文库,获得差异表达基因cDNA片段。并对差异表达片段作初步分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用的大豆材料为本实验室培育的抗花叶病毒病品种东农8143,接种所用的大豆花叶病毒为黑龙江流行的1号株系。材料种植与接种方法如下:将东农8143种植于培养钵中,待一对对生真叶展开后,用人工摩擦接种法将花叶病毒接种在真叶上,然后将苗放于室内,以防止蚜虫对未接种的样本进行侵染。

### 1.2 方法

**1.2.1 mRNA的提取及检测:**样本接种后,每隔24h取样,连续取样8次。每棵幼苗剪取叶子2片,液氮研磨。未接种样本和接种后样本取样时间及取样部位与接种样本一致。按照总RNA提取试剂盒TRIZOL(GIBCOBRL)的方法提取总RNA。按照Promega公司的PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation试剂盒方法从总RNA中分离纯化mRNA,并用紫外分光光度计检测8个时期处理mRNA样品的浓度和纯度。用DEPC处理水将样品等量混合。

**1.2.2 抑制性消减杂交:**抑制消减杂交具体操作依照CLONTECH试剂盒PCR-Select<sup>™</sup> cDNA Subtraction Kit进行,以接种病毒的材料作为消减杂交的实验方(Tester),以未接种病毒的材料作为驱动方(Driver)。

**1.2.3 cDNA文库构建:**扩增产物按照Promega公司的PCR产物纯化试剂盒的方法进行纯化,纯化后与pGEM-T easy载体连接,形成cDNA质粒文库。采用热激法转化质粒后的感受态细胞DH5 $\alpha$ 涂于含Amp的LB/X-gal/IPTG培养基上筛选,挑取白色克隆。

**1.2.4 质粒提取与测序:**随机挑取64个阳性克隆,按碱裂解法提取阳性质粒,测序交由上海生工生物工程公司完成。

**1.2.5 RT-PCR验证:**采用相同的材料和方法处理大豆品种东农8143,分别在接种后0、12、24、36、48、60、72、84、108、132、156、180、204、228、252h取样,提取大豆叶片总RNA。用紫外分光光度计检测15个时期处理总RNA样品的浓度和纯度。用DEPC水调整各个时期的浓度,使其相等。选取其中5个较长EST序列设计引物,进行RT-PCR扩增。同时将大豆40S核糖体基因设为内置对照。

**1.2.6 序列分析:**序列经去除载体序列后,将所得到的EST用BLAST<sub>i</sub>软件和BLAST<sub>x</sub>软件与GenBank unigene库中的序列进行同源性比对分析。

## 2 结果

### 2.1 总RNA及mRNA的质量检测

紫外分光光度计检测显示总RNA和mRNA吸光度 $A_{260}/A_{280} > 1.90$ 。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测:总RNA可清晰见28S、18S和5S三条带,其中28S rRNA和18S rRNA呈现2:1的比例;mRNA为 $> 0.5$ kb清晰彗尾片状条带。

### 2.2 消减文库质量检测

连接产物经热激转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,经蓝白斑筛选得到阳性克隆2000个,表明文库滴度较高,转化效率较好。随机挑选64个阳性克隆进行PCR扩增,均能扩增出有效产物,条带多在200~500bp左右。

### 2.3 序列测定结果

随机挑取64个阳性克隆提取质粒,检测后测序。去除测序效果不好的EST序列,共获得质量较好的EST序列50条。测序结果显示ESTs片段中最短的为136bp,最长的691bp,平均长度为456bp,有41条序列带有poly(A)尾。

### 2.4 RT-PCR分析

对5个差异表达的EST进行RT-PCR扩增后,发现所选取的5个差异表达片段均受病毒诱导。图1是差异表达基因CY88接种后不同时期RT-PCR结果,由图可以看出基因CY88没有接种时有轻微的表达,随着接种时数的增加,表达逐渐增强,72h到达峰值。随后表达呈下降趋势,而在204h又出现一个小峰。

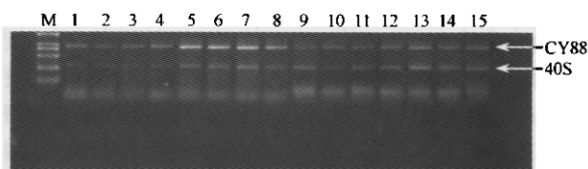


图1 CY88 RT-PCR扩增结果

Fig.1 RT-PCR result of CY88

M:DL2000; 1: RT-PCR of non-inoculated samples; 2~15: RT-PCR after inoculating 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 108h, 132h, 156h, 180h, 204h, 228h, 252h.

### 2.5 表达谱分析

将所获得的50条新EST序列提交GenBank的dbEST数据库,获得登录号如下:dbEST-ID为26613115-26613156; 26613925-26613932,对应的GenBank-Accn为CV997220-

CV997261;CV998030-CV998037。将测序结果到 GenBank 进行 BLASTn 和 BLASTx 比对,其中 38 个有比较明确的比对结果。测序表明抗病相关的 EST 表达谱包括的同源基因涉及 21 种生物,基因功能涉及大豆的细胞自身保护、信号传导、抑制病原菌生长、系统获得性抗性以及与光合作用、呼吸作用、蛋白质合成等相关的持家基因<sup>[3]</sup>。详见表 1。功能基因不明确或新基因有 12 个。其登录号分别为:CV997221、CV997234、CV997235、CV997238、CV997239、CV997244、CV997246、CV997252、CV997253、CV997256、CV998031、CV998035。

表 1 差异表达基因同源比较结果

Table 1 Identity compare results of differently expressed gene

Catalogue of related genes	Number of related genes
Cellular protect	2
Signal transduction	6
Restrict pathogen growth	2
System acquired resistance	12
Housekeeping genes	12
Others	4

3 讨论

Diatchenko 等建立了一种应用 PCR 方法的消减杂交技术<sup>[2]</sup>。SSH 由于具有高度敏感性、操作简便、目的序列富集程度高,且丰度相对一致等突出优点,自 1996 年问世以来便受到广泛关注,到目前为止已有许多成功报道<sup>[4-9]</sup>。随着研究水平的深入和研究手段的提高,研究人员创建了一些大规模、高通量研究基因表达的方法<sup>[10]</sup>。表达序列标签技术(EST)即是其中之一。该技术由 Breaner<sup>+</sup>等人在人类基因组研究中提出<sup>[11]</sup>,随后在植物功能基因组学研究中也被广泛应用<sup>[12]</sup>。应用 SSH 技术,可以有效分离出差异表达基因,为从整体水平研究基因的差异表达情况,进行大规模、高通量的基因功能研究提供了有效的技术支持。

本研究所得的 50 个 EST 序列中 38 个可以比对出较为明确的结果,涉及大豆抗病机制的各个方面,但这些基因是否真正具有抗病相关功能还需进一步研究。而对于 12 个未知功能基因,由于其中几个部分序列较短,无法通过 GenBank 进行 BLASTn 和 BLASTx 比对,所以还不能确认为新基因,需要进一步验证。随机选取的 5 个阳性克隆进行的 RT-PCR 反应说明,5 个阳性克隆在诱导前后均有表达丰度的差异。在 RT-PCR 反应中作为内置对照的大豆 40S 核糖体基因也随诱导前后有较弱的波动。以它作为标准采用 Quantity-One 软件对基因 CY88 的表达进行标准化,呈现出与图 1 所示相同的表达趋势。进一步说明了 CY88 基因受接种病毒诱导,可能与抗病性相关。

综上所述,利用 SSH 技术构建差异表达基因文库,并通过 EST 技术研究抗病过程所有抗病相关基因的表达情况,从

总体上阐述植物抗病机制已成为可行性的方法。抗病基因的研究不仅仅是抗病过程的识别和抗病基因的开启,更要注重抗病过程中系列基因的表达以及抗病信号的传递和级联反应,这将更加有助于我们对抗病机制的深入理解。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Wan Ji, Matthew B Wright, Li C *et al.* Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics*, 2002, 3(1) : 12

[ 2 ] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP *et al.* Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93025 - 6030

[ 3 ] Bevan M, Bancroft I, Bent E *et al.* Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 1998, 391: 485 - 488

[ 4 ] Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV *et al.* Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(4): 1116 - 1123

[ 5 ] Liu ZW(刘占武), Zhao MJ(赵慕钧), Li ZP(李载平). Identification of up-regulated genes in rat regenerating liver tissue by suppression subtractive hybridization. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2001, 33(2): 191 - 197

[ 6 ] Jin CG(金成刚), Li Y(李燕), Chen WF(陈慰峰). Molecular cloning of novel genes involved in T cell development using suppression subtractive hybridization. *Journal of Beijing Medical University*(北京医科大学学报), 2000, 32(4): 303 - 305

[ 7 ] Gurskaya NG, Diatchenko L, Chencik A *et al.* Equalization cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate13-ad. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240: 90 - 97

[ 8 ] Liu J(刘军), Liu JD(刘建东), Yuan ZQ(袁自强) *et al.* Isolation and identification of genes expressed differentially in rice inflorescence meristem with suppression subtractive hybridization. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 2001, 46(2): 98 - 101

[ 9 ] Guo XH(郭新红), Jiang XC(姜孝成), Pan XL(潘晓玲) *et al.* Isolation and cloning of cDNA related with the genes of halonxylonammოდendron (Mey.) Bge. seedlings induced by osmotic stress by suppression subtractive hybridization. *Acta Phytophysiological Sinica*(植物生理学报), 2001, 27(5): 401 - 406

[ 10 ] Terryn N, Rouze P, Montagu. Plant genomics. *FEBS Letter*, 1999, 452: 3 - 6

[ 11 ] Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD *et al.* Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 1991, 252(5013): 1651 - 1656

[ 12 ] Luo Meng, Jia Ji-Zeng. Progress in expressed sequence tags(EST) project of plant genome. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, 28(4): 494 - 497